

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biologických a lékařských věd



ÚLOHA STŘEVNÍHO MIKROBIOMU V IMUNITNÍCH ONEMOCNĚNÍCH
CENTRÁLNÍHO NERVOVÉHO SYSTÉMU

Diplomová práce

Barbora Zedníková

Vedoucí práce: Doc. MUDr. Josef Herink, DrSc.

Hradec Králové

2016

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Katedra: biologických a lékařských věd

Na akademický rok: 2015/2016

Jméno a příjmení: Bc. Barbora Zedníková

Studijní program: zdravotnická bioanalytika – navazující magisterské st.

Vedoucí diplomové práce: doc. MUDr. Josef Herink, DrSc.

Název diplomové práce: Úloha střevního mikrobiomu v imunitních onemocněních centrálního nervového systému

Název diplomové práce v angličtině: The role of the gut microbiome in immune-mediated CNS disorders

Zásady pro vypracování:

Abstrakt

1. Úvod a cíl práce
2. Střevní imunitní systém
3. Imunitní systém mozku
4. Genetické, epigenetické a mikrobiální rizikové faktory demyelinizačních onemocnění CNS
5. Patogeny jako spouštěče autoimunitních dějů v CNS
6. Střevní komensálové jako modulátory imunity CNS
7. Závěr (význam pro zdravotnickou praxi)
8. Seznam doporučené literatury

Seznam odborné literatury:

Berer K., Krishnamoorthy G.: Microbial view of central nervous system autoimmunity. *FEBS Lett.*, 2014 (v tisku)

Frič P.: Střevní mikroflóra, gastrointestinální ekosystém a probiotika. *Med. Pro Praxi*, 7, 2010, 408–414.

Ochoa-Repáraz J., Kasper L. H.: Gut microbiome and the risk factors in central nervous system. *FEBS Lett.*, 588, 2014, 4214–4222.

Sun J., Chang E. B.: Exploring gut microbes in human health and disease: Pushing the envelope. *Genes Dis.*, 2014 (v tisku)

Taggart H., Bergstrom L.: An overview of the microbiome and the effects of antibiotics. *J. Nurse Pract.*, 10, 2014, 445–451.

Wang Y., Kasper L. H.: The role of microbiome in central nervous system disorders. *Brain*

Behav. Immunity, 38, 2014, 1–12.

Závada F.: Gastrointestinální imunitní systém. *Med. Pro Praxi*, 7, 2010, 268–269.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 26. 4. 2016

Podpis:

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěla poděkovat všem, kteří mi nějakým způsobem pomáhali a podporovali při tvorbě této práce. Zejména pak svému školiteli Doc. MUDr. Josefu Herinkovi, DrSc. za vstřícnost, trpělivost, cenné rady, připomínky, odborné vedení a poskytnutí odborné literatury, díky kterému tato práce mohla být sepsána.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Kandidát: Bc. Barbora Zedníková

Školitel: Doc. MUDr. Josef Herink, DrSc.

Název diplomové práce: Úloha střevního mikrobiomu v imunitních onemocněních centrální nervové soustavy

Lidské tělo osídluje velké množství mikroorganismů, mezi které patří *Archea*, *Eukarya*, *Bacteria* a viry. Tento soubor mikroorganismů tvoří mikrobiom, který řádově desetkrát převyšuje počet lidských buněk. Nejpočetnější část mikrobiomu se nachází v trávicím systému. Současným rozvojem metod molekulární genetiky došlo k odhalení úzkého vztahu mezi intestinálním mikrobiomem a zdravím. Nejnovější studie poukázaly na spojitost mikrobiomu s patogenezí různých onemocnění. Tato diplomová práce se zabývá souvislostmi působení intestinálního mikrobiomu a imunitních onemocnění centrální nervové soustavy. Dosavadní poznatky naznačují, že změny ve složení mikrobiomu vyvolané různými vlivy vedou ke zvýšené stimulaci imunitního systému a tím k podpoře zánětlivé proliferace v nervové tkáni.

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Candidate: Bc. Barbora Zedníková

Supervisor: Doc. MUDr. Josef Herink, DrSc.

Title of diploma thesis: The role of the gut microbiome in immune-mediated CNS disorders

Human body hosts a large number of microorganisms – i.e. Archea, Eukarya, Bacteria and viruses. These microorganisms form microbiome, the total number of the microorganisms is ten times higher than the number of all human cells. Largest part of the microbiome is located in the intestine. The current development of molecular genetics revealed the close relationship between intestinal microbiome and health. Recent studies the most recent studies have pointed to a connection with the pathogenesis of various diseases. This dissertation is focused on the connection between intestinal microbiome and autoimmune diseases of the central nervous system. Research shows that the key factor are the ongoing changes in the composition of microbiome. These changes lead to increased immune stimulation and thereby to inflammatory proliferation.

Obsah

1.	Úvod.....	10
2.	Vývoj mikrobiomu trávicího traktu.....	11
2.1	Profylaxe E. Coli.....	11
2.2	Negativní účinky na mikrobiom při terapii antibiotiky podávaných v dětství.....	12
2.3	Vliv stravy na strukturu mikrobiomu	12
2.4	Změny mikrobiomu způsobené stárnutím organismu	12
3.	Charakteristika střevního mikrobiomu.....	14
3.1	Funkce střevního mikrobiomu.....	15
3.2	Stanovení a diagnostika střevního mikrobiomu	15
3.3	Klasifikace dle enterotypu.....	16
3.4	Ovlivnění střevního mikrobiomu prebiotiky	17
3.5	Ovlivnění střevního mikrobiomu probiotiky.....	17
3.6	Eubiotika	19
3.7	Synbiotika.....	19
3.8	Antibiotika a jejich pozitivní a negativní účinek na mikrobiom	19
3.8.1	Terapie antibiotiky při léčbě autismu	20
4.	Gastrointestinální imunitní systém.....	21
4.1	Slizniční imunita a mechanismus vzniku zánětů.....	22
4.2	Imunologická střevní tolerance	24
4.3	Sensibilizace bakteriemi z potravy a přirozené mikroflóry.....	24
5.	Imunita mozku	25
5.1	Funkce mikroglií	25
5.2	Funkce astrocytů	27
5.3	Hematoencefalická bariéra.....	27
5.4	Komunikace mezi střevem a CNS.....	27
5.5	Vliv CNS na mikrobiom	30
5.6	Heterogenita mozku a vrozená imunitní odpověď	30
5.6.1	Význam interferonů při imunitní odpovědi.....	31

5.6.2	Indukce IFN I a exprese ISGS.....	31
5.6.3	Buněčná specificita v CNS.....	32
5.6.4	Terapie pomocí INF-1	32
6.	Mikrobiom ve vztahu k autoimunitním onemocněním	34
6.1	Mechanismus vzniku autoimunitních onemocnění CNS	34
6.2	Souvislost vzniku autoimunitního onemocnění s dietními faktory	36
6.3	Predispozice k vzniku sclerosis multiplex.....	36
6.3.1	Příznaky roztroušené sklerózy.....	37
6.4	Mechanismus vzniku RS	38
6.5	Metabolity střev jako rizikový faktor vzniku imunitních chorob.....	38
6.6	Mikrobiální produkty jako rizikový faktor rozvoje imunitních onemocnění.....	39
7.	Závěr	40
8.	Použité zkratky	41
9.	Seznam obrázků	43
10.	Poznámky	44
11.	Seznam použité literatury.....	45

1. Úvod

Termín mikrobiom použil jako první americký molekulární biolog Joshua Lederberg a označil tak souhrn mikroorganismů a jejich genů v organismu (převzato z: Lederberg, Human Genome Project, 2003). Mikrobiom mohou tvořit viry, plísně, eukaryota, houby a bakterie. Tyto bakterie tvoří specifický ekosystém, v němž interagují nejen mezi sebou navzájem, ale důležitým faktorem jsou i jejich interakce s hostitelským organismem, především s jeho imunitním systémem. Nynější studie nejrozličnějších mikroorganismů střevního ekosystému a to zejména bakteriálních populací ukazují, že právě ty zastávají zásadní roli v mnoha aspektech lidského zdraví, které byly donedávna přehlíženy. Mikroorganismy obvykle vytvářejí s lidským tělem symbiotické spojení, ale mohou také působit jako patogeny a způsobovat onemocnění.

2. Vývoj mikrobiomu trávicího traktu

Vývoj mikrobiomu začíná průchodem porodními cestami, kdy dochází ke kontaktu s vaginální mikroflórou. Nejprve kolonizují fekální mikroorganismy z rodu *Enterobacter*, *Streptococcus* a *Staphylococcus*. Způsob porodu hraje velkou roli při formování mikroflóry. Při porodu císařským řezem nejprve osídlují mikrobiota z kožní mikrobiální flóry. V USA se při tomto způsobu porodu používá tzv. *seeding*, kdy se gázou s vaginálním stěrem potře novorozenci obličej a vkládá se do úst. Tento úkon není vždy prováděn, ale bylo prokázáno, že má pozitivní vliv na budoucí vývoj mikrobiomu jedince. Dalším zdrojem osídlení v prvních dnech života je matčina kožní, ústní a nosní mikrobiální flóra. Osídlování mikroby probíhá v prvních dnech od narození a to hlavně orální cestou přes dutinu ústní směrem k žaludku a poté šířením do střevních částí trávicího traktu. V kojeneckém období dochází k rozvíjení mikroflóry zejména kontaminací z mateřského mléka či z jeho náhražek. Dochází k nárůstu skupin *Bacteroides*, *Enterobacteriaceae* a dominanci anaerobů. Osídlení viry v časném dětství je pravděpodobně nezbytné i pro správný vývoj imunitního systému. U nekojených jedinců se v prvních měsících tvoří komplex téměř úplného spektra mikroflóry. Dominuje skupina *Enterobacteriaceae* a anaerobní bakteroidy. U kojených dominují ve stolici anaeroby se značnou převahou bifidobakterií. Tento stav přetrvává po dobu kojení. Pozitivní vliv kojení na formaci mikrobiomu se projevuje strukturálně i funkčně. Kojení má nejenom příznivý vliv na rozvoj slizniční imunity, ale bakterie modulují biologickou aktivitu epitelových buněk. Další substance obsažené v mateřském mléce, jako jsou imunoglobuliny, laktoferin a další příznivě působí na imunitu jedince. Klinické zkušenosti dokazují, že kojené děti lépe snášejí enterální infekce, septikémie, ale také infekce urogenitálního traktu, než děti odstavené od mateřského mléka. Deregulace mikrobiomu vede k abnormalitám slizniční a systémové imunity s možným rozvojem imunopatologií.

Další roky dětství jsou nadále ovlivněny délkou období kojení. Millova studie prokázala u časně odstavených dětí v pozdějším věku častější výskyt potravních alergií a průjemových onemocnění. Mezi 3–5 rokem dochází prakticky ke konečnému formování mikroflóry, která se již podstatně neodlišuje od mikroflóry v dospělosti. [1, 2, 6, 28]

2.1 Profylaxe E. Coli

Mimořádně důležitý je vývoj osídlování kmeny *E. Coli*, který probíhá orálním přenosem prostřednictvím matky. Na pozitivní vliv profylaxe apatogenními kmeny

v prvních týdnech po narození poukázali vědci Nissle a Leygraf. Aplikací profylaxe významně snížili výskyt patogenních kmenů a napomohli pozitivnímu rozvoji imunitního systému kojenců. [25, 26]

2.2 Negativní účinky na mikrobiom při terapii antibiotiky podávaných v dětství

Negativní vliv na střevní mikrobiota má terapie antibiotiky podaná v časném období života. Antibiotika jsou schopna odstraňovat větší část střevních mikrobiot a nepřímo snížit kolonizační rezistenci v trávicím traktu. Důsledky po podávání antibiotik přetrvávají i měsíce po ukončení léčby. Doložené poznatky o souvislostech podání antibiotik dětem v časných etapách jejich vývoje a rozvoji alergických nemocí jsou hojně dokumentovány. Tenhle fakt potvrdil, že narušení přirozené mikroflóry způsobuje ztrátu fyziologických regulací imunitní soustavy, která se v mnohých případech manifestuje jako imunopatologická reakce. [1, 2, 25, 26, 28]

2.3 Vliv stravy na strukturu mikrobiomu

Je podstatné zmínit další faktory, které nadále ovlivňují strukturu mikrobiomu a to stravovací návyky jedince a místo dlouhodobého pobytu. Je prokázáno, že mikroflóra jedince žijícího v určité zemi s určitými stravovacími návyky se i po přesídlení nemění a tento rozdíl trvá dlouhodobě. Molekulárně genetická analýza ukázala, že u obézních lidí kvantitativně převažuje kmen *Firmicutes* oproti kmenu *Bacteroides* ve srovnání s normostenickými jedinci. Při tomto stavu také dochází ke snížení Bifidobakterií a objevují se neobvyklé druhy jako jsou *Halomonas* a *Sphingomonas*. Mikroorganismy kmenu *Firmicutes* produkují specifické enzymy k trávení nestravitelných zbytků potravy a poskytují tak jedinci další energetický zdroj. [1, 4, 25]

2.4 Změny mikrobiomu způsobené stárnutím organismu

Fyziologická struktura mikroflóry není v průběhu života neměnná. Ve vyšším věku se mikroflóra mění. Dochází k vyšší vnímavosti k infekcím a progresi chorob. Změny se týkají především kolonické mikroflóry. Kvalitativní struktura se většinou nemění, rozdíl je zaznamenán v kvantitativním zastoupení jednotlivých složek. Dochází k poklesu bifidobakterií a roste podíl sulfbakterií, methanogenů, bakteroidů a grampozitivních anaerobů. Působením těchto kmenů se zvyšuje produkce sirovodíku, častěji dochází k methanogenezi, acetogenezi a k poklesu tvorby mastných kyselin (především máslé, kyseliny mléčné, kyseliny octové).

propionové, mléčné a octové). Důsledky této změny vedou ke zhoršení výživy kolonické mukózy. Dochází ke snížení kolonické pH, redukcí oportunních složek mikroflóry (pseudomonád, kvasinek, stafylokoků aj) a inhibici růstu patogenů. Kvalita slizničního hlenu tlustého střeva se mění, snižuje se bariéra proti translokaci bakterií a bakteriálních toxinů tak, že se přibližuje modelu imunokompromitovaných nemocných. Tyhle změny byly vysledovány ze studií prováděných v ekonomicky vyspělých zemích. V těchto studiích se však obvykle nerozlišuje, nakolik šlo o přirozený proces stárnutí organismu či jak mikrobiom ovlivnily stravovací návyky jedince. [1, 25, 26]

3. Charakteristika střevního mikrobiomu

Trávicí trubice je v různé intenzitě osídlena mikroorganismy a to bakteriemi, kvasinkami, plísněmi, viry a dalšími druhy mikroorganismů. V trávicím traktu je kolem 100 bilionů bakterií, které náleží k tisíci různých druhů. Metagenomická analýza stolice odhalila přítomnost tří milionů střevních mikrobiálních genů. Dostatečně ovšem neinformuje o složení střevní mikrobiální sliznice. Udává se, že střevní mikrobiom váží zhruba 1–1,5 kg, což můžeme přirovnat k hmotnosti centrální nervové soustavy. Střevní mikrobiota člověka je tvořena zhruba 40 dominantními mikrobiálními druhy. Mezi první mikroby, které kolonizují střevo, patří aerobní a fakultativně aerobní druhy koliformních mikrobů, laktobacilů a streptokoků. Tyto populace způsobují snížení oxidoredukčního potenciálu ve střevě a tím umožní osídlení střeva anaerobními mikroby rodů *Bacteroides* a *Bifidobacterium*. V důsledku zavedení pevné stravy se složení střevní mikrobioty postupně mění a přibližuje se k definitivnímu stavu s převahou anaerobů, jak tomu je u dospělých jedinců. Složení střevního mikrobiomu je u zdravého jedince poměrně stabilní a nedochází k výrazným změnám. Jak již bylo uvedeno, fyziologické změny nastávají při procesu stárnutí. V tlustém střevě se nachází největší koncentrace mikroorganismů. Tyto mikroorganismy vytváří anaerobní bioreaktor, který umožňuje degradaci nestrávených a nestravitelných složek potravy. Také zajišťují biosyntézu mikronutrientů a vytváří esenciální mastné kyseliny s krátkým řetězcem. Tyhle procesy zajišťují pro lidský organismus 10 % veškeré energie. V důsledku chorob, užívání antibiotik, probiotik, prebiotik a skladby potravy se může složení střevní mikrobioty měnit. Mikrobiota dospělého člověka je převážně tvořena zástupci jen dvou bakteriálních kmenů gram pozitivních bakterií kmenů *Firmicutes* (65 % klonů) a gram negativních *Bacteroides* (23 % klonů). Nejpočetnější jsou rody *Bacteroides*, *Fudobacterium*, *Clostridium*, *Peptococcus* a *Bifidobacterium*, menšími zástupci *Escherichia coli* a *Lactobacillus*. Bakterie v trávicím traktu mezi sebou komunikují pomocí tzv. *quorum sensing*, látek podobných hormonům – autoinducerů. Tento signální systém *quorum sensing* bakteriím umožňuje koordinovaně regulovat expresi svých genů. Důsledkem toho je schopnost synchronizovat svoje chování a jednat jako mnohobuněčný organismus. Signální systém *quorum sensing* je schopen do určité míry komunikovat i s epitelovými buňkami hostitele. Existence některých bakterií hostitele může podněcovat tvorbu složitých fukosylovaných cukrů epitelovými buňkami, které jsou nadále využívány bakteriemi jako zdroj energie. V současnosti přibývá informací, že komenzální bakterie ovlivňují i genovou expresi mimo

slizniční struktury a je například možné nalézt vztah mezi konkrétními osídlovacími vzory GIT a nepřiměřeným ukládáním tuku vedoucím k obezitě. Udává se, že jedna třetina střevní mikroflóry je u většiny lidí shodná, zatímco dvě třetiny jsou specifické pro jednotlivce. Proto může být určitý střevní mikrobiom příčinou individuální predispozice k onemocněním. Tento fakt je ovlivněn vlastním genomem, imunitou, potravou i užíváním léků. Množství bakterií ve střevě je dále ovlivněno jak pohyblivostí střev, tak také kyselostí žaludku. Snížení peristaltiky obecně způsobuje navýšení počtu bakterií. [1, 2, 3, 4, 5, 24, 26]

3.1 Funkce střevního mikrobiomu

Střevní mikrobiom se účastní látkových procesů, jeho robustnost se dá srovnat s metabolismem jater. Zároveň ovlivňuje střevní funkce (sekreci, vstřebávání, motilitu a splachnickou cirkulaci). Střevní epitel využívá produkty vzniklé z trávení, ale také využívá nestrávené zbytky potravy, které se stávají substráty mikrobiálních enzymů. Přijímaná vláknina a škrob se přeměňují na krátké mastné kyseliny a plyny (nejčastěji vodík a methan). Hlavním energetickým substrátem kolonocytů je butyrát. Tyto procesy mají trofický účinek na střevní sliznici a přispívají k homeostáze sliznice. Glukóza a aminokyseliny, především glutamin, jsou nadále využity pro intermediální metabolismus kolonocytů, růst a reparační funkce. Střevní mikroflóra může ale i produkovat škodlivé substance, např. sirovodík. Střevní mikrobiom má nezastupitelný význam pro vývoj a zrání imunitního systému, napomáhá při trávení potravy, syntetizuje mastné kyseliny, zabraňuje vstupu a osídlení patogenními mikroorganismy, neutralizuje toxické látky a rozkládá uvolněné enterocyty. Poskytuje lidskému tělu důležité vitaminy B a K₂. Některé druhy střevních bakterií mají také významné imunomodulační účinky. Indikují tvorbu sekrečního imunoglobulinu chránícího povrchy v trávicím a dýchacím traktu. [1, 2, 3, 5, 7, 24, 26]

3.2 Stanovení a diagnostika střevního mikrobiomu

Střevní mikroflóra člověka představuje složitý systém. Kvalitativní a kvantitativní složení známe dosud pouze zčásti. Používané specifické kultivační metody jsou schopny identifikovat méně než polovinu mikrobiálních druhů. Původní údaj, že střevní mikroflóra obsahuje 400-500 druhů se výrazně změnil použitím metod molekulární genetiky. Gastrointestinální mikrobiologie tím vstoupila do nové éry, tzv. metagenomiky. Tyto metody umožňují identifikaci celých mikrobiálních populací ve fyziologickém stavu bez nutnosti kultivace. Cílem těchto metod je stanovit metagenom (genom všech mikrobiálních

druhů) a dokonale poznat mikrobiom (souhrn všech mikrobů, jejich genetické výbavy i interakcí). Sekvenční genetická analýza s použitím malých podjednotek ribosomální RNA (rRNA) umožňuje identifikaci celých mikrobiálních populací a to bez použití kultivace. Techniky přímého sekvenování ampliconů 16S rDNA a mikročipy se používají pro přímou fylogenetickou kvantifikaci a identifikaci. Sekvence zkoumaného vzorku se srovnávají se sekvencemi dobře charakterizovaných izolátů získaných kultivačními metodami, tzv. profily střevních společenství. Předpokládá se, že podobnost sekvencí odráží fylogenetickou příbuznost. Fingerprintové molekulární techniky se používají pro detekci studia dynamických změn ve složení bakteriální populace, při pozorování účinků antimikrobiální léčby na střevní mikrobiom a pro monitoring vlivu terapie prebiotiky a probiotiky. Mezi techniky aplikované pro kvantifikaci bakteriálních druhů patří metoda PCR real time, FISH a dot blot hybridizace. V současnosti se odhaduje současný počet rodů na 1 800 a počet druhů na 15 000 – 36 000. Studium mikroflóry ze žaludečních biopsií se ukázalo, že žaludek osídluje hlavně mikroby kmene *Proteobacteria*, nejčastěji *Helicobacter pylori*. Mikroorganismy jednotlivých kmenů v žaludku a ve střevě se překrývají přes chemicky odlišné prostředí v obou lokalizacích. Mikroflóra trávicí trubice je rozprostřena jednak proximodistálně a jednak radiálně. Luminární flóra tračníku se odlišuje od slizniční flóry v kontaktu s epitelem a imunitním systémem. Složení slizniční flóry v jednotlivých částech tračníku je relativně shodné, pravděpodobně v důsledku stálějšího fyzikálně-chemického prostředí ve srovnání s lumen. Mikrobiologické vyšetření stolice dostatečně neinformuje o složení slizniční střevní mikroflóry a proto je nutné pro zpřesnění indikovat bioptické vyšetření. [2, 13, 25, 26]

3.3 Klasifikace dle enterotypu

V současné době rozlišujeme tři druhy enterotypů. U enterotypu 1 převažuje mikrobiální osídlení skupiny *Bacteroides*. Dieta bývá převážně složená z proteinů a živočišných tuků. Bylo prokázáno, že tenhle enterotyp má vliv na produkci vitamínů C, B₂ a B₅ a H a je spjatý s přeměnou komplexních uhlohydrátů na látky, které jsou jednodušeji absorbovatelné. Enterotyp 2 je charakterizován dominancí bakterie *Prevotella*. Převaha těchto bakterií má za následek zvýšenou produkci vitamínu B₁ a kyseliny listové a souvisí s desulfatizací mucinu. V dietě převládají především sacharidy. U enterotypu 3 dominuje rod *Ruminococcus*, dieta je bohatá na polynenasycené tuky a alkohol. Tenhle rod je spojený s degradací mucinu a hydrolýzou cukrů. Bylo zjištěno, že enterotyp není závislý na konzumované potravě. Dosud je ovšem tohle rozdělení enterotypů diskutabilní. [12]

3.4 Ovlivnění střevního mikrobiomu prebiotiky

Prebiotika jsou nestravitelné neživé složky potravy. Fungují jako energetické substráty a jsou nenatratitelné trávicími enzymy, ale natratitelné enzymy střevní mikroflóry a probiotik. V organismu účinně a selektivně stimulují růst a aktivitu fyziologické mikroflóry trávicího traktu, zejména v tlustém střevě. Současně mohou působit jako inhibitory růstu a metabolismu nedominantní složky digestivní mikroflóry. Zajišťují také výživu střevní mikroflóry včetně probiotik a vyživují střevní sliznici. Zlepšují proces trávení a z dlouhodobého hlediska mohou pozitivně ovlivnit zdravotní stav hostitele. Prebiotika jsou látky na bázi nevstřebatelných substancí, které procházejí horními částmi trávicího traktu bez relativní změny a nesmí být v těchto místech degradovány. Funkčně jsou po té využívány jen určitými bakteriemi v tlustém střevě. Po chemické stránce se jedná o značně širokou skupinu látek do které patří jednoduché sacharidy (např. laktulóza), oligosacharidy, polysacharidy (např. inulin), fruktooligosacharidy a transgalaktosylované oligosacharidy. Prebiotika jsou obsaženy v cibuli, artyčocích, česneku, pórků, čekance, luštěninách a v malém množství i v obilovinách. Prebiotické oligosacharidy nebo disacharidy modulují složení mikroflóry kolon ku prospěchu přirozených mikroorganismů. Prebiotické oligosacharidy jsou po laktóze a lipidech v pořadí třetí největší složkou mateřského mléka, což potvrzuje pozitivní účinky kojení. Mezi přirozené prebiotika patří též vláknina. Je to složka potravy, která přechází do tračníku v nezměněné formě. Pod pojem vláknina se řadí celulóza, hemicelulóza a lignin. Jedná se o látky rostlinného původu, které nejsou rozkládány enzymy trávicího traktu. Vláknině obsažené v potravinách je přisuzován velký význam v terapii hyperlipidemií, prevenci kolorektálního karcinomu a vaskulárních příhod zejména v kardiologii. [1, 17, 26]

3.5 Ovlivnění střevního mikrobiomu probiotiky

Probiotika jsou živé mikrobiální doplňky stravy, které příznivě ovlivňují mikrobiální rovnováhu trávicího traktu. Tyto preparáty musí splňovat relativně přísné požadavky pro jejich léčebné využití. Mezi základní požadavky patří podrobná definice mikroorganismů, musí být zaručena jejich čistota, musí být vyloučeny patogenní vlastnosti (tvorba enterotoxinů a cytotoxinů), schopnost osídlení tračníku, odolnost k trávicím sekretům, schopnost adheze k střevnímu epitelu, bezpečnost aplikace v živém stavu a v neposlední řadě příznivý účinek na zdravotní stav. V současné době jsou nejčastěji využívány k přípravě probiotik skupiny nepatogenních *E. Coli*, skupiny laktobacilů a bifidobakterií, *Streptococcus salivarius*, *Saccharimycetes boulardi*, laktokoky, enterokoky. Probiotika se

různí po stránce vlastností i funkcí v závislosti na genetickém vybavení, které se v jednotlivých klasifikačních stupních liší až do úrovně druhu. Lidský původ probiotik je žádoucí. Hlavní funkcí probiotik je ochrana slizniční epiteliální bariéry. Předpokládaný fyziologický účinek probiotik se předpokládá při koncentraci kolonií (CFU) $10^8/\text{g}$ preparátu a minimální terapeutický účinek při koncentraci 10^{10} CFU/g. Účinnost je ovšem závislá na množství mikroorganismů v cílovém místě, kvalitě ochranného obalu preparátu a účinků trávicích sekretů (kyselina chlorovodíková, žluč, digestivní enzymy). Probiotika jsou v současné době používána jako léčiva i jako doplňky zdravého životního stylu. Je prokázáno, že použití probiotik snižuje výskyt a dobu některých průjemových onemocnění. Většina probiotik se v současnosti deklaruje jako potravinový doplněk, není tudíž požadován žádný fyziologický ani klinicky prokázaný terapeutický účinek. Pro vývoj probiotické terapie by bylo ovšem do budoucna žádoucí stanovení kritérií pro probiotická léčiva a jejich povinnou registraci jako je tomu u klasických léčiv. Přestože jsou nežádoucí účinky při použití probiotik vzácné, v posledních letech se diskutuje o tom, zdali existuje riziko přenosu genů antibiotické rezistence. Některé koliformní mikroby, ke kterým patří i probiotikum ECN, jsou totiž schopny produkovat látky, které mohou tlumit buněčný cyklus a apoptózu a poškozují DNA. Důsledkem toho setrvávají mikroby ve střevě po delší dobu, zvyšuje se možnost adherence ke střevnímu epitelu a pomnožení mikrobiálních populací. Je tedy otázkou, jestli některé druhy *Escherichie coli* mohou představovat dispoziční faktor pro vznik kolorektálního karcinomu. Tento proces byl zjištěn v tkáňových kulturách vysoce maligních buněk při koncentracích nepravděpodobných podmínkách in vivo, proto se tato hypotéza nepovažuje za dostatečně podloženou. Laktobacily inhibují stresem způsobenou zvýšenou intestinální permeabilitu a acidifikují tračník. *Bifidobacterium bifidum* působí protektivně na sliznici žaludku a snižuje důsledky stresových situací. Ve velké studii bylo prokázáno, že podání probiotických mikroorganismů těhotným ženám a kojencům má velmi pozitivní účinek na udržení homeostázy. Podání *Lactobacillus rhamnosus* GG zredukovalo IgE zprostředkovaných alergických nemocí u dětí. Kombinace tří probiotických druhů *Bifidobacterium bifidum*, *Lactococcus lactis* a *Bifidobacterium infantis* podávaných prenatálně matkám dětí s vysokou predikcí rozvoje atopické dermatitidy, alergické rinitidy, astmatu a potravních alergií po dobu 12 měsíců jejich dětem výrazně snižovala výskyt atopické dermatitidy. In vitro pokusy prokázaly, že vybrané kmeny jsou schopny stimulovat produkci IL-10 v monocytech. Interleukin-10 má imunoregulační účinky a působí protizánětlivě. V této

studii se prokázalo, že tlumil tvorbu cytokinů subsetem TH2 lymfocytů, což je klíčový prvek k rozvoji alergického zánětu. [1, 17, 24, 26]

3.6 Eubiotika

Eubiotika trávicího traktu jsou živé mikrobiální kultury nebo metabolické produkty mléčného kvašení, produkty růstu a množení probiotik. Příznivě působí v trávicím traktu, upravují činnost sliznice střeva, přispívají k mikrobiologické rovnováze a působí ve prospěch hostitele. [1, 26]

3.7 Synbiotika

Synbiotika jsou preparáty z prebiotik a probiotik. Obal synbiotika v ideálním případě tvoří prebiotikum do kterého je vloženo probiotikum. Jedná se o léčebně velmi perspektivní preparáty používané dosud jako potravinové doplňky. [1, 26]

3.8 Antibiotika a jejich pozitivní a negativní účinek na mikrobiom

Antibiotika ovlivňují mikrofóru trávicího traktu dvěma způsoby. Negativně – způsobují dysmikrobii, postantibiotické průjemy tzv. AAD (*antibiotics associated diarrhoea*) a hemoragické kolitidy AAC (*antibiotics associated colitis*). U lehkých případů příznaky často ustoupí, ovšem manifestní AAC s nálezem klostridiových toxinů musí být adekvátně léčena. V terapii antibiotiky se nejčastěji používá metronidazol, vankomycin a rifaximin. Vankomycin je z trávicího traktu špatně vstřebatelný, je vysoce koncentrován ve stolici, u většiny kmenů *Clostridia difficile* je ovšem terapie účinná. Od roku 1995 roste rezistence enterokoků na vankomycin, to je spojeno s vytvořením genetické rezistence u *Staphylococcus aureus*. Vankomycin je doposud používán jako preparát poslední volby obrany před virulentními kmeny zlatých stafylokoků. Doporučuje se proto používat nejdříve metronidazol, který má ovšem systémové nežádoucí účinky, které se projevují zejména nauzeou, periferní neuropatií, ataxií, může způsobit i psychické změny. Studie na zvířatech ukázaly, že tento preparát je mutagenní a kancerogenní, proto se již od jeho použití upouští. Antibiotika působí pozitivně při terapii střevních infekcí, idiopatických střevních zánětů, syndromu bakteriálního přerůstání a jaterní encefalopatii. Indikují se také při kolitidách, které vznikly s negativně působící antibiotickou léčbou, také v preoperační a postoperační profylaxi infekčních komplikací a v selektivní střevní dekontaminaci u imunokompromitovaných jedinců. Nepřímé klinické důkazy ukazují, že antibiotika působí antidepresivně. Výzkum proběhl u preparátů minocyklinu, doxycyklinu

a ceftriaxonu. Naopak u antibiotik norfloxacinu a fluorochinolonů obecně byly účinky nežádoucí a objevily se i depresivní symptomy. [1, 2, 17, 24, 26]

3.8.1 Terapie antibiotiky při léčbě autismu

Autismus je doposud považován za vrozenou vývojovou poruchu CNS. Ačkoliv mechanismy vzniku této nemoci nejsou doposud známy, nejnovější studie poukazují na význam složení mikrobiomu při vzniku i dalším rozvoji této nemoci. V roce 2000 v nemocnici Chicago Rush probíhala neoficiální studie, během které lékaři podávali 10 autistickým dětem vankomycin a následně monitorovali případné změny v jejich chování. Vankomycin patří mezi tricyklické glykosylované neribozomální peptidy. Účinnost je založena na inhibici syntézy buněčné stěny grampozitivních bakterií. Bývá vyhrazen jako lék poslední volby. U 8 z 10 dětí zaznamenali lékaři výrazné zlepšení příznaků. Bylo prokázáno, že ke změně střevní mikroflóry organismu může vést událost ovlivňující imunitu matky během gravidity a to například podání antibiotik, infekce, ale také přítomnost alergie, či očkování. V roce 1998 upozornil Dr. Wakefield na spojitost mezi chronickým zánětem střev a autismem. Obohatil studie o poznatek, že u většiny autistických dětí probíhá střevní zánět. V roce 2012 byly zveřejněny výsledky o spojitosti mezi autismem a bakterií *Sutterella*, u dětí postižených autismem se nacházely vysoké hladiny *Sutterella* sekvencí. [9, 10, 11]

4. Gastrointestinální imunitní systém

Imunitní systém trávicího traktu je nedílnou součástí bariéry mezi vnějším a vnitřním prostředím organismu. Jeho složky fungují společně s ostatními buněčnými elementy slizničního systému a zajišťují udržování homeostázy v dynamické rovnováze. Zajišťuje ochranu sliznice před vnikem patogenním mikroorganismů i nemikrobiálních antigenů do vnitřního prostředí a integrity stěny střeva. Zásadním účelem gastrointestinálního imunitního systému je vznik orální tolerance, kdy dochází k útlumu nežádoucí systémové imunitní odpovědi na široké spektrum potravinových alergenů. Imunogenní antigeny pronikají střevní stěnou do oběhu, protože 1–2 % potravinových antigenů odolává enzymatickému štěpení. Imunitu gastrointestinálního traktu lze rozlišit na vrozenou a získanou. Vrozená imunita zahrnuje neimunologickou složku, kterou vytváří řada fyzikálních a chemických bariér. Ty vyvazují a rozkládají patogenní látky a mikroorganismy a zabraňují jejich vstupu. Jedná se o žaludeční sekrece o kyselém pH, trávící enzymy, žlučové kyseliny a střevní mikrobiom společně s integritou střevní stěny a peristaltikou. Imunologická složka zahrnuje buněčné a solubilní elementy. Imunitních reakcí se účastní téměř všechny buňky intestina a to především fagocyty, žírné buňky, epiteliální buňky a NK buňky. Jejich funkcí je zneškodňovat patogeny, likvidovat buňky alterované infekcí či nádorovým bujením. Adaptivní imunita odráží individuální působení samostatných antigenů v průběhu života a s pomocí humorální imunity, vycházející z B lymfocytů, zasahuje v extracelulárním prostředí. Mikrobiom trávicího traktu je otevřený ekosystém vystavený nepřetržitému vlivu faktorů biologických, chemických a fyzikálních, které mohou narušit její rovnováhu a stát se potenciálním zdrojem onemocnění trávicího traktu nebo celého organismu. Střevní mikroflóra již v časném období reguluje vývoj slizničního imunitního systému, jeho systémové a lokální odpovědi, včetně odpovědi na potravinové a mikrobiální antigeny. Střevní mikroflóra, slizniční imunitní systém a slizniční střevní bariéra tvoří gastrointestinální ekosystém. Je to vysoce integrovaný komplex, kdy se jeho jednotlivé složky mohou rozvíjet samostatně jen omezeně. Střevní mikroflóra má velký význam pro vývoj slizničního imunitního systému v časném dětství, především v prvních letech života. Interakce mikrobiálních ligandů (např. lipopolysacharidů) s receptory střevního epitelu a dendritických buněk vytvářejí tolerogenní odpověď udržovanou dalšími mediátory (např. TGF-beta a IL-10). Střevní mikroflóra a slizniční imunitní systém mají kritický význam pro vývoj slizniční bariéry. Transportní strukturou jsou mikrovilózní zóna enterocytů a tzv. těsná spojení mezi nimi.

Transcelulární transport je složitý proces, v kterém střevní mikroflóra a slizniční imunitní systém rozhodují o charakteru imunitní reakce (tolerogenní nebo imunogenní). Paracelulární transport je omezen na malou skupinu látek a umožňuje pasáž látek o vyšší molekulové hmotnosti a také antigenů.

V trávicím traktu dochází k nejvýznamnější a nejkomplexnější interakci se zevním prostředím. Jeho imunitní systém zajišťuje obranu před patogeny a toxiny, které by mohly narušit střevní integritu a homeostázu celého organismu. Musí zajišťovat rozlišení antigenních stimulů od neškodných komenzálů a složek lidské potravy, které pro organismus nepředstavují žádné riziko. Tyto procesy se odehrávají na všech površích sliznice a to zejména v traktu respiračním a urogenitálním. Proto evolučně vznikly specializované slizniční lymfoidní tkáň MALT (*mucosa associated lymphoid tissue*), které zastávají homeostatickou funkci. MALT je svým rozsahem i funkcí nejvýznamnějším sekundárním orgánem imunitního systému. [2, 14, 25, 26]

4.1 Slizniční imunita a mechanismus vzniku zánětů

Pokud je tento komplexní systém narušen chemickými či jiným patologickým zásahem, následná imunitní odpověď může u geneticky predisponovaného jedince vyústit v nespecifický střevní zánět. Etiopatogeneze těchto zánětů zůstává stále neobjasněna. Aktuální studie nasvědčují tomu, že zásadní roli hraje programovaná buněčná smrt T-lymfocytů a porušená funkce střevní epiteliální bariéry. Ve slizničním imunitním systému převažuje imunoglobulinový IgA izotyp, vyskytující se jak na sliznicích, tak ve slizničních sekretech. V trávicím traktu dochází k nejintenzivnější interakci se zevním prostředím, proto v tomto důsledku došlo k jisté adaptaci slizničního imunitního systému, proto se od ostatních funkčních jednotek odlišuje. Označuje se jako střevní lymfoidní tkáň GALT (*gut associated lymphoid tissue*) a skládá se z několika funkčně a anatomicky oddělených celků. Povrch sliznice střeva dosahuje povrchu přibližně 300 m² a do jeho lumen se denně transportuje téměř 5 g imunoglobulinů IgA. Peyerovy pláty jsou makroskopické struktury, kryté z velké části lemem enterocytů a nacházející se ve sliznici a submucose střeva. Jejich hlavní funkcí je rozpoznávání antigenů pomocí specializovaných M-buněk. Ty jsou vmezeřeny mezi epitelií spojené s Peyerovými pláty. Obdobně fungují i dendritické buňky. Dendritické buňky, nacházející se v lamina propria jsou schopny pronikat mezi epitelovými buňkami svými výběžky až do střevního lumen. Zde dochází ke vzorkování mikrobiálních podnětů s následnou prezentací specifické imunitě. Lamina propria je umístěna pod střevním epitelem, je to celek T a B lymfocytů,

plazmatických buněk, *natural-killer* buněk, makrofágů, dendritických a žírných buněk. Významnou část v populaci T lymfocytů v lamina propria tvoří buňky paměťové, které se kontaktovaly s antigeny v Peyerových plátech. Antigeny, které jsou transportované M buňkami, přicházejí extraluminárně do kontaktu s lymfocyty, makrofágy a dendritickými buňkami. Tenhle proces vede k indukci regulačních T-lymfocytů, které reagují tvorbou cytokinů s protizánětlivým působením optimalizujících slizniční odpověď a indukujících slizniční toleranci. Je však třeba objasnit zda je spouštěčem této kaskády antigen tělu vlastní – autoantigen, či antigen cizí – heteroantigen. [2, 8, 16, 23, 25, 26, 28]

Aktivace nezralých lymfocytů probíhá prezentací antigenů v lymfoidních folikulech. Ty dále migrují do lymfatických uzlin, mění se na B a T-lymfoblasty a putují do periferní krve. Po té vstupují do lamina propria a díky interakcím s plochými endoteliálními buňkami se usazují ve sliznici. Tento proces je označován jako *homíng*. B lymfoblasty dozrávají v IgA, které produkují plazmatické buňky pod kontrolou T lymfocytů. Usazené lymfoblasty v lamina propria po ukončení vyžrávání a změně v efektorové buňky zajišťují imunoprotekci. Imunitní procesy probíhající na sliznicích nemají jen lokální význam, jsou součástí slizniční imunity jiných orgánových soustav. Významné interakce se vyskytují mezi enterocyty a imunitními buňkami trávicího traktu. Epitelové buňky mají schopnost identifikovat nebezpečné mikrobiální noxy pomocí svých receptorů PRRs⁶ (*Pattern Recognition Receptors*). Buňky imunitního systému mohou ovlivňovat sekreci a absorpci elektrolytů enterocyty. Enterocyty produkují enzymy a interleukiny, které se podílejí na zánětlivých reakcích. Pomocnou roli v sekreci imunoglobulinů hrají CD4+ lymfocyty. Další T-lymfocyty získávají roli imunoregulátorů. B lymfocyty tvoří cca 40% podíl lymfoidních buněk v lamina propria. Funkčně se ujímají produkce IgA imunoglobulinů, ostatní imunoglobuliny jsou produkovány méně. IgA imunoglobuliny jsou vylučovány ve formě dimerů a jejich syntéza a sekrece představují v rámci trávicího systému zásadní imunitní mechanismus. Imunoglobuliny IgA jsou pomocí transportního mechanismu sekreční složky epitelálních buněk tenkého střeva secernovány do lumen. Sekreční složka funguje jako ochrana imunoglobulinů před degradací v agresivním prostředí lumen. IgA jsou vylučovány i do žluče a tím ochraňují žlučové cesty před kontaminací. Hlavní funkcí IgA je snižování adheze bakterií k buňkám epitelu, zabráňování kolonizace a proliferace těchto patogenů, zároveň inhibují viry, zabráňují jejich transportu střevním epitelem a neutralizují toxiny. Intraepiteliální lymfocyty se nachází mezi epitelálními buňkami a jsou vmezeřeny podél jejich bazolaterálních pólů. Ve 100 kléich se jich vyskytuje cca 10–20, což tvoří významný podíl na celkové populaci lymfocytů v lidském organismu. Jedná

se zejména o CD8+ lymfocyty. Jejich rysy se v mnoha ohledech liší od lymfocytů v systémové cirkulaci. Většina těchto lymfocytů působí v kolon, část v tenkém střevě, kde rozeznávají MHC povrchové molekuly I třídy a působí cíleně cytotoxicky na poškozené epitelové buňky. [2, 23, 24, 25, 26]

4.2 Imunologická střevní tolerance

Významným obdobím pro optimální nastavení imunitní reaktivity je kojenecké období. Kvůli pestrosti a intenzitě podnětů na sliznicích musí být slizniční imunitní systém přesně regulován. Není možné reagovat na všechny podněty, proto je zde obrana regulována tak, aby škodliviny z vnějšího prostředí byly eliminovány ještě předtím než by došlo ke stimulaci slizniční imunity. Na většinu podnětů, které nepředstavují jednoznačné signály nebezpečí je indukována imunologická tolerance. Spočívá v omezení zánětlivé reakce na antigeny z přijímané potravy a na antigeny velkého spektra bakterií přítomných ve střevě. [25, 26]

4.3 Sensibilizace bakteriemi z potravy a přirozené mikroflóry

Studie potvrdily přítomnost sérologické imunitní odpovědi na některé bakterie, které jsou součástí fyziologické střevní mikroflóry nebo přicházejí do trávicího traktu s potravou. Tuto imunitní odpověď představují protilátky proti *Sacharomyces cerevisiae*. Jedná se o kvasinku používanou v pekařství a pivovarnictví. Titr těchto protilátek (ASCA) bývá vysoký u Crohnovy choroby. Částečným podnětem pro aktivaci protilátek jsou části *Escherichia coli*, konkrétně porin C a flagelin. Protilátky byly také potvrzeny proti *Pseudomonas aeruginosa*, jež se může v malém množství vyskytovat ve střevní mikroflóře. [2, 5, 16]

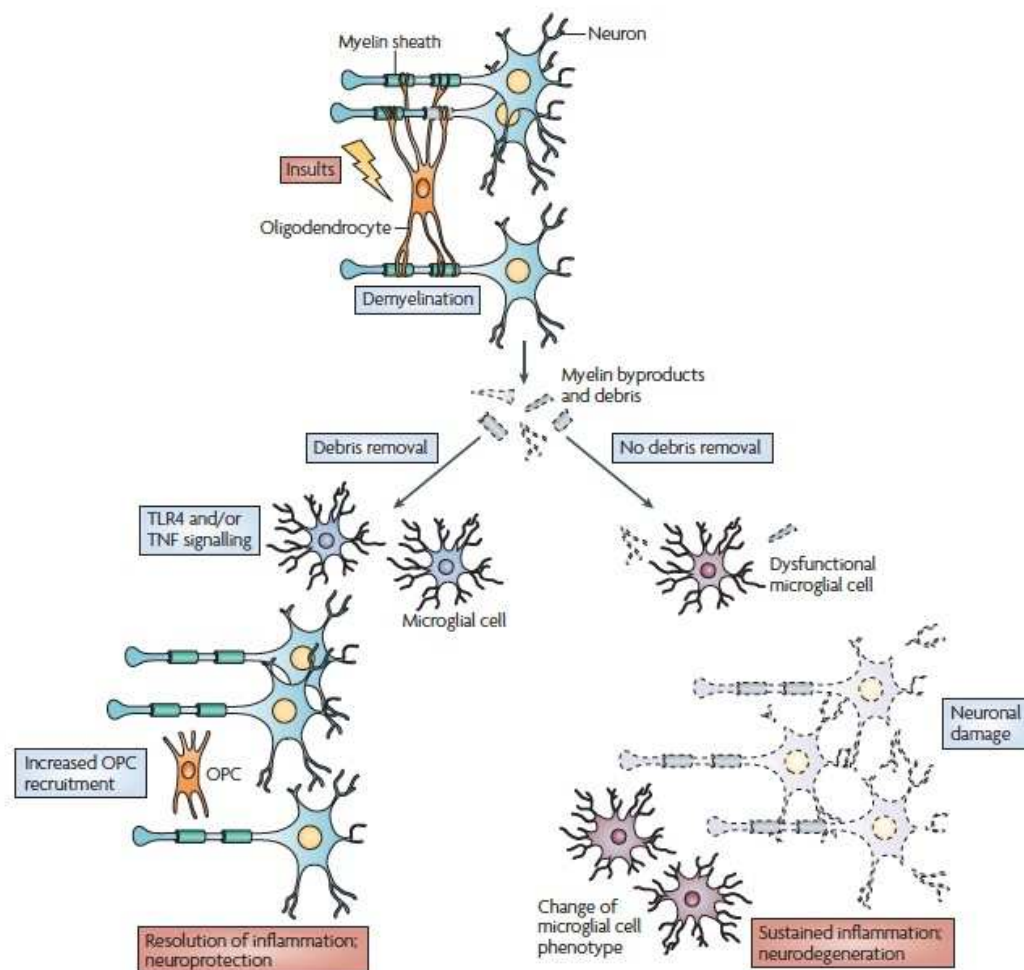
5. Imunita mozku

Imunitní funkce CNS obstarávají specifické typy buněk (mikroglie, astrocyty) a hematoencefalická bariéra (HEB). Mikroglie jsou vysoce senzibilní, mobilní, fagocytující buňky funkčně podobné makrofágům. Jsou to antigen prezentující buňky, čímž stimulují T-lymfocyty a jsou zodpovědné za reakce akutní fáze v mozku. Mají mezenchymální původ a během vývoje osídlují nervový systém z krevního řečiště ještě před uzavřením hematoencefalické bariéry. Při jejich stimulaci dochází ke zvýšenému počtu proliferací makroglíí v CNS. Masivní infekce pak způsobí zvýšenou propustnost HEB a do mozku pronikají fagocyty z periferie a také nediferencované kmenové buňky z kostní dřeně, které zde v mikroglie dozrávají. [31]

5.1 Funkce mikroglíí

Mikroglie zastávají velké množství různých funkcí, zejména imunitních i vedoucích k udržení homeostázy. Představují 5–15 % buněk CNS. Jsou extrémně plastické, vyskytují se v mnoha podobách dle funkce a lokalizace. Mikroglie jsou důležité při vývoji mozku, odstraňují totiž nadbytečný materiál. Fagocytují poškozené, apoptotické buňky, fragmenty DNA a neurální klubka. Mikroglie secernují proteázy, které přímo poškozují buňky, cytokiny jako interleukin-1 (IL-1) spouští demyelinizaci axonů. Mechanismus nazývaný obnažování synapsí probíhá tak, že prozánětlivé mikroglie odstraňují nervové větve blízko poškozené tkáně, což vede ke zvýšené neurogenезi a restauraci poškozených neurálních kruhů. Reparační procesy zajišťuje sekrece protizánětlivých cytokinů, na revaskularizaci se účastní astrocyty. Poškození neuronu může probíhat také cestou NMDA receptoru, kdy mikroglie a astrocyty secernují glutamát a aspartát. Cytotoxicita představuje účinnou obranu proti virům, bakteriím a poškozeným buňkám, ale může poškozovat množství okolních neuronů a tím vyústit v chronický zánět. Mikroglie aktivují specifické signální molekuly. Aktivací interferonu gama (INF- γ) produkuje mikroglie další INF- γ do extracelulárního prostředí a tím dochází k aktivaci dalších mikroglíí. Mikroglie produkují tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- α), který indukuje apoptózu a zvyšuje zánětlivou aktivaci. IL-8 stimuluje růst a aktivaci B-buněk, IL-1 způsobuje inhibici IL-10 a tumor růstový faktor beta (TGF- β). Tento mechanismus ústí v „down“ regulaci prezentace antigenu. Produkci IL1- β a TNF- α aktivovaná mikroglie blokuje transportní

mechanismy odstraňující glutamát z neuronů, následné zvýšení množství glutamátu je toxické. [31]



Obrázek 1 Duální charakter vrozené imunitní odpovědi v centrálním nervovém systému. Převzato z: Rivest (2009).

Inzult (záněť, nekróza) vede k narušení funkce oligodendrocytů, jejímž důsledkem je rozpad myelinu a nadměrná tvorba debris (v podstatě odpadních produktů), kterou je nutno odstranit. V případě funkčních buněk mikroglie se tak děje na základě TLR-4/TNF signalizace a náboru oligodendrocytových prekursorových buněk (OPC), které ve svém výsledku posílí procesy remyelinizace axonů a neuroprotektce. V případě dysfunkční mikroglie je tento proces přerušen, dochází k poškození nervových buněk; pokud dojde k fenotypickým změnám mikroglie tak se neurodegenerativní procesy udržují.

Mikroglie reagují na patogeny produkcí prozánětlivých cytokinů. Součástí odezvy je i transkripční aktivace vrozených imunitních genů. Aktivace TLR 4 receptoru může být vyvolána lipopolysacharidem nebo přítomností TNF, což způsobuje další aktivaci mikroglíí, které pak efektivněji odstraňují myelinovou drť a tím zabraňují hromadění nečistot v extracelulárním prostoru. Zvýšením progenitorových buněk oligodendrocytů dochází k remyelinizaci a ochraně neuronů. Bez rychlého odstranění myelinových zbytků

nebo toxických sloučenin z mozku a mikroglíí může dojít k protizánětlivé odezvě, která vede k demyelinizaci a synaptické dysfunkci, následně pak k neurodegeneraci. Ve zjednodušené podobě jsou možné cesty reakce mikroglie na inzult znázorněny na obrázku 1.

5.2 Funkce astrocytů

Dle morfologie rozlišujeme tři základní typy astrocytů. V bílé hmotě astrocyty radiální a fibrilární a v šedé hmotě protoplazmatické astrocyty. Dále se astrocyty rozdělují na GlutT typ a GlutR typ. GlutT typ exprimuje glutamátové transportéry a GlutR typ exprimuje glutamátové receptory. Astrocyty udržují stálé iontové složení extracelulární tekutiny, účastní se při uvolňování a zpětném vychytávání neurotransmiterů, jako je glutamát, GABA, ATP a slouží také jako energetický zdroj pro neurony, protože obsahují laktát a jako jediné buňky mozku také glykogen. Účastní se také vazomodulace pomocí různých působků ovlivňujících propustnost cév, což úzce souvisí s vytvářením hematoencefalické bariéry. Astrocyty spolupracují s oligodendrocyty, produkují *cytokine leukemia inhibitory factor* (LIF), který stimuluje oligodendrocyty k produkci myelinu. Při poškození nervové tkáně astrocyty fagocytují porušené nervové buňky a vyplňují vzniklý prostor gliální jizvou. Astrocyty mají i inzulinové receptory. Narušený glukózový metabolismus je pozorován jako možné klíčové místo již prokázané souvislosti mezi diabetem a depresí, případně i Alzheimerovou chorobou. [31]

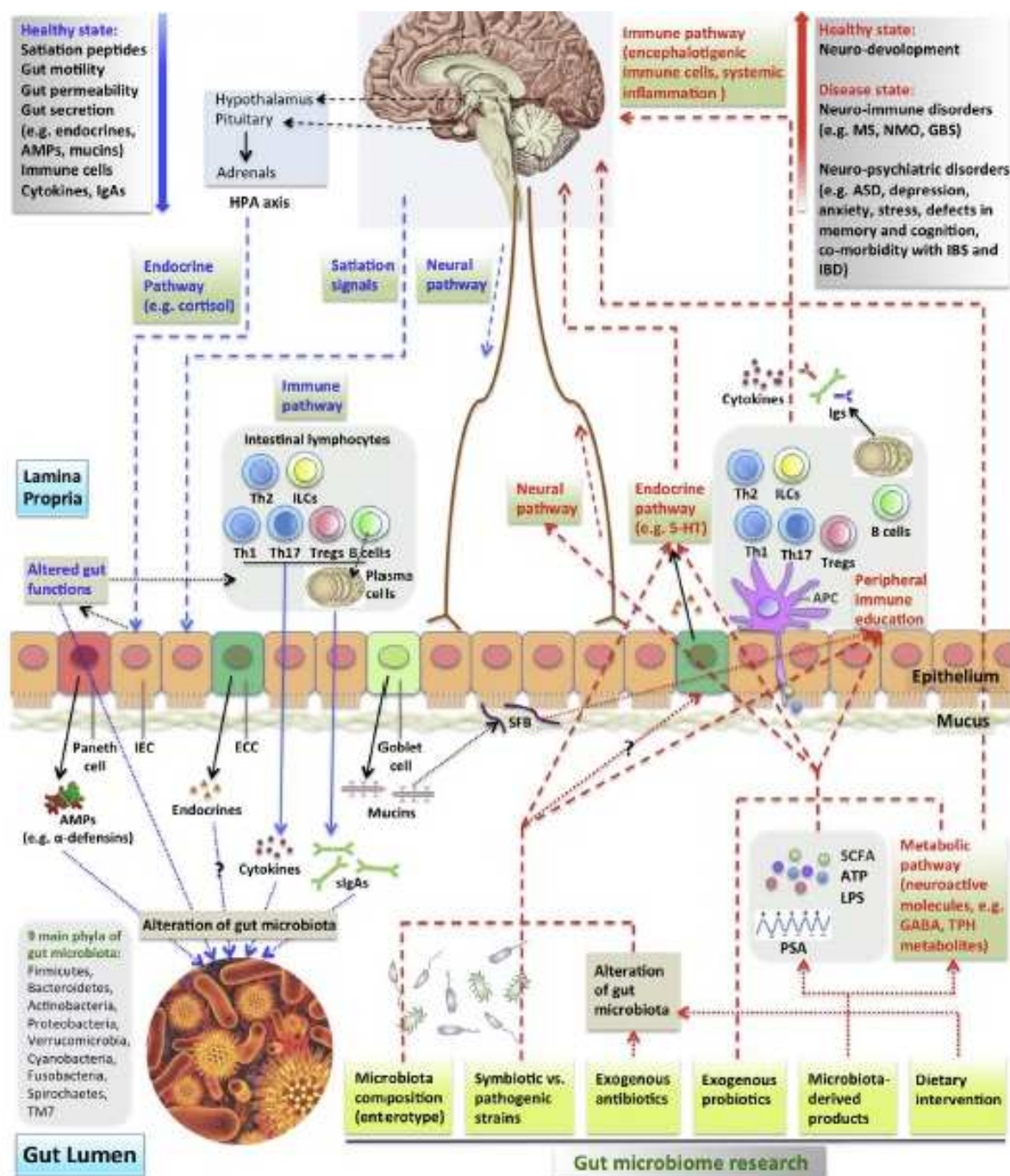
5.3 Hematoencefalická bariéra

Hraje v mozku významnou funkční roli. Dlouho byla považována za nepropustný filtr. Díky poznatkům kinetiky transportu a objevením specifických transportérů se HEB dostala do role aktivního účastníka metabolismu mozku. Transportní systémy zajišťují přenos nejrozličnějších látek do mozku (přenašeč glukózy GLUT-1, L1 amino acid transporter) i z něj (P-glycoprotein). Dnes je známo, že saturačním transportním systémem mimo jiné přestupují IL1- α , β , antagonisté IL-1 receptoru, TNF- α , granulocytární kolonie stimulující faktor, *cytokine leukemia inhibitory factor*, IFN- γ , ciliary neurotrofní faktor (CNTF). Pasivní nesaturační systém využívá IL-2. [31]

5.4 Komunikace mezi střevem a CNS

Střevní mikrobiom hraje stěžejní roli v obousměrné dráze mozek-střevo, která spojuje střevní aktivitu s činností CNS. Studie ukazují jak různé podoby neuro-imunních a neuro-

psychiatrických poruch korelují se změnami mikrobiomu. Nervové, endokrinní a metabolické mechanismy jsou taktéž kritickými činiteli, které se mohou ve spojení s mikrobiomem uplatňovat v neuro-psychiatrických poruchách jako je autismus, deprese, úzkost a stres. Střevo přijímá regulační signály z CNS a naopak. Vztahy mezi mikrobiomem a neuroendokrinním systémem jsou komplexní a velmi složité. Termín osa mozek–střevo charakterizuje interaktivní fyziologický koncept, který zahrnuje vše, včetně drah aferentních a eferentních, endokrinních a imunologických a přenáší signály mezi CNS a gastrointestinálním systémem. Neuroimunomodulace je řízena převážně limbickým a hypotalamo-hypofyzárním systémem, viz obrázek 2. Řada cytokinů působí jako neurotransmitery/neuromodulátory, podobně se uplatňují také některé hormony. Neurotransmitery nemají účinky jen na neuronech, astrocytech a mikrogliích, ale taktéž na buňkách endokrinních žláz a imunocytech. Neustále se hromadí literatura, která poukazuje na význam mikrobiomu ve funkci střev napomohla vývoji nového konceptu vzájemného vztahu mikrobiom–střevo–mozek. Již dvě hodiny stresu mohou změnit složení mikrobiomu. Rozlišujeme přímý vliv CNS, kdy dochází k neuroendokrinní sekreci, která je podmíněná bakteriálními receptory. Nepřímý vliv působí na střevní funkce a reguluje imunitní odpovědi. Výzkum role mikrobiomu v poruchách CNS prohlubuje vědecké znalosti o vztahu mikrobiom–hostitel a jejich komenzalismu. Tyto znalosti jsou dále použity pro vyvíjení nové prognostiky a nových terapeutických postupů při léčení chorob CNS. [2, 24, 30, 31]



Obrázek 2 Osa mikrobiom–střevo–mozek ve vztahu k onemocnění centrálního nervového systému. Převzato z: Wang a Kasper (2013).

Vícenásobné cesty mikrobiom–střevo–mozek vedou směrem nahoru a dolů v závislosti zdraví a nemoci. CNS směrem dolů ovládá složení střevní mikrobioty přes signální peptidy sytosti, které ovlivňují dostupnost živin. HPA osa reguluje uvolňování kortizolu, který ovlivňuje pohyb a integritu střeva. Endokrinní a nervové cesty mohou také regulovat vylučování různých látek ze specializovaných střevních epitelových buněk. Tyto sekreční produkty mohou lokálně ovlivnit prostředí a přežití rezidentní mikroflóry. Směrem vzhůru střevní mikrobiom ovládá CNS prostřednictvím přímé aktivace neuronů, žláz s vnitřní sekrecí, syntézy metabolických neuroaktivních molekul a infiltrací imunitních buněk při systémovém zánětu. Zkratky: AMPs – antimikrobiální peptidy, TPH- tryptofan, 5-HT – 5 hydroxytryptamin, SFB-segmentované

vláknité bakterie, PSA – polysacharid A z *B. fragilis*, ATP – adenosintrifosfát, SCFA – mastné kyseliny s krátkým řetězcem, IEC – střevní epitelální buňka, ILC – vrozené lymfatické buňky, APC – antigen prezentující buňka, MS – roztroušená skleróza, NMO – neuromyelitis optica, GBS – Guillain-Barrého syndrom, ASD – poruchy autistického spektra, IBS – syndrom dráždivého tračníku, IBD – zánětlivá střevní choroba.

5.5 Vliv CNS na mikrobiom

Signální dráha CNS–střevo–mikrobiom je regulována přes centrum sytosti nacházející se v hypotalamu. Změny v charakteru stravování v důsledku regulace centra příjmu potravy mohou mít dopad na dostupnost a složení živin ve střevě. Signální proteiny pocitu sytosti umožňují inhibici této regulace. Tyto peptidy, například PYY, jsou po jídle transportovány skrz krevní oběh do mozku, kde vyvíjí pocit sytosti. Signální proteiny nasycení pocházejí z gastrointestinálního traktu, ale mnohé z nich jsou také syntetizovány v mozku. CNS může mít vliv na střevní mikrobiom prostřednictvím endokrinních a nervových drah. Autonomní nervový systém (ANS) a hypothalamo–hypofýzo–nadledvinkový systém zajišťují interakce mezi CNS a viscerálními orgány. Modulují střevní motilitu, sekreci a epitelální propustnost. Rovněž ovlivňují sekreci hormonů. Bylo zjištěno, že stres ovlivňuje mikrobiom a aktivuje žírné buňky. Žírné buňky mozku jsou důležitý zdroj prozánětlivých cytokinů (IL-1, TNF- α). Nachází se hlavně v oblasti ventrálního hypotalamu. Při podnětu, jakým může být viscerální bolest, vylévají žírné buňky připravená granula. Následné uvolnění signálních molekul, tzn. cytokinů a antimikrobiálních peptidů (AMPs) do střevního lumen neurony, enteroendokrinními buňkami, imunitním systémem a Panethovými buňkami, má velmi pravděpodobně bezprostřední vliv na střevní mikrobiotu. Neustále zkoumaná je také úloha neuroimunomodulace a vliv regulační osy mozek–střevo na střevní zánět a jeho přetrvávání. Předpokládá se, že nespecifické střevní záněty představují heterogenní skupinu nemocí, které stejnými mechanismy poškozují tkáň, ale navzájem se odlišují spouštěcím momentem a imunoregulačními abnormalitami. Recentní studie se zaměřují na lepší pochopení počátečních zásahů do imunitní tolerance a epitelální odpovědi k mikroorganismům. Mohou být podkladem pro nové terapeutické možnosti. [2, 24, 30]

5.6 Heterogenita mozku a vrozená imunitní odpověď

CNS je vysoce komplexní orgán s velmi specializovanými podtypy buněk. Bakteriální infekce působí často specificky v určitých strukturách mozku. Studie na myších s deficitním interferonem 1 typu (IFN 1) potvrdily jeho význam v obraně proti infekcím

a neviróvým autoimunitním onemocněním. Přímé antibakteriální účinky IFN 1 se zdají být důležité hlavně při počátečním šíření časně bakteriální infekce v nervové tkáni. V této souvislosti bude důležité přesněji identifikovat buňky, které produkují IFN, dešifrovat cesty vedoucí k expresi IFN 1 a charakterizovat proběhlé reakce. Mezi faktory, které hrají důležitou roli při imunitní odpovědi, patří brána vstupu infekce, ale také senzitivita různých typů buněk, heterogenita cílových subpopulací i okamžitý stav mikroprostředí. [31, 32]

5.6.1 Význam interferonů při imunitní odpovědi

Po vstupu patogenu nastupuje první linie obrany, které se účastní INF-1. Po vstupu patogenu dochází k lokální expresi IFN-1 a následkem toho k inhibici a šíření infekce. IFN- 1 mohou být produkovány v různé míře všemi buňkami CNS, hlavně astrocyty, ale také oligodendrocyty, mikroglie a neurony. Samotné místo produkce IFN-1 buňkami se může lišit v závislosti na patogenu, místu a infikovaném typu buňky. Na expresi IFN- α a IFN- β reagují stejné poznávací receptory, které však mají rozdílné úlohy při mechanismu obrany před infekcí. Cytosolové a endosomální senzory, mezi které patří RIG-1-like receptory⁴, Toll-like⁸ receptory a cyklická GMP-AMP syntáza asi nejlépe charakterizují tento proces. Exprese sensorových proteinů se může vzájemně lišit mezi danými typy buněk a konkrétními oblastmi mozku. Zatímco dendritické buňky obecně vykazují vysokou produkci IFN aktivací TLR-7, produkce astrocytů kolísá v závislosti na kombinaci PRRs a IFN, odpovědi jsou velmi složitě a rozdílně regulovány. Vstupní brány patogenu a výsledné imunitní odpovědi mohou předurčovat nejen závažnost, ale také výsledek infekce. Tento fakt je podporován pozorováním, že i samotný způsob bakteriální nákazy často určuje náchylnost hostitele k bakteriálním infekcím. [32]

5.6.2 Indukce IFN I a exprese ISGS

IFNs 1 typu mohou být produkovány neurony, astrocyty, oligodendrocyty a mikroglie, ale také infiltrací imunitních buněk v průběhu imunitní odpovědi. Interferonové regulační faktory (IRFs) regulují IFN-1 odpověď, která indukuje širokou škálu interferony stimulovaných genů (ISGS). Některé IRFs jako IRF-3 a IRF-9 jsou konstitutivně exprimovány. Pro prodělání infekce dochází ke stimulaci IRF-1, IRF-5, IRF-7 a IRF-9, které jsou prokázány v jednotlivých lokalizacích v mozku. Bylo dokázáno, že hladiny některých IRFs jsou buněčně specifické, například IRF-7 byl nalezen zejména

v astrocytech, mikroglíích ale také v neuronech, zatímco IRF-9 byl prokázán téměř výhradně v mononukleárních buňkách.

5.6.3 Buněčná specificita v CNS

Některé typy buněk jsou náchylnější k infekcím, nejcitlivější v tomto směru jsou neurony. Neurony a astrocyty z různých oblastí mozku mohou navíc vykazovat rozdílnou sensibilitu na škodlivé podněty a to může předurčovat jak typ, tak samotný průběh infekce.

5.6.4 Terapie pomocí INF-1

Výskyt jednotlivých buněk imunitního systému je v jednotlivých částech mozku nerovnoměrný. Během zánětlivých procesů obsahuje mozkový kmen, mozeček a mícha více imunitních buněk než mozková kůra. To přímo ovlivňuje výsledek zánětu nebo infekce. Dojde-li k mechanickému poškození v mozkové kůře nebo v míše, pronikají buňky imunitního systému hlouběji do tkáně. Z toho je zřejmé, že ne všechny oblasti CNS jsou stejně vybavené proti útočícím patogenům. Tento fakt přímo ovlivňuje závažnost infekce a tudíž i přežití hostitele. Metodami *in vitro* byla již na různých typech buněk studována řada faktorů souvisejících s infekcí. Přesto bývají opomíjeny důležité faktory, jako je původ izolovaných buněk, existence buněčných subpopulací a vzájemné interakce mezi nimi. To samé se dá říct o studiích infekcí v CNS *in vivo*. Místní rozdíly v iniciaci lokální odpovědi IFN 1 se ukazují být stálým cílem dalšího výzkumu. V tomto ohledu by slibný směr představovalo vzájemné srovnání typu specifické imunitní odpovědi v postižené a zdravé nervové tkáni ve vztahu k různým oblastem mozku. Detailnější poznání jednotlivých expresních profilů vrozené imunity a relevantních průvodních faktorů může být rovněž přínosná pro nové terapeutické postupy. Bylo prokázáno, že méně diferenciované buňky jsou více náchylné k infekci. Například nově vznikající neurony v hippocampu, či bulbus olfactorius představují místo nízké odolnosti proti infekci. Rozdílná přítomnost buněk imunitního systému v jednotlivých oblastech mozku může tedy mít podstatný vliv na účinné odstraňování patogenů. Stále však není jasné, jestli mícha, mozkový kmen a mozeček jsou oblasti náchylnější k poškození zánětem než mozková kůra. Tato fakta mohou být stěžejní i v mechanismu vzniku neurodegenerativních chorob. Přesnější poznání lokálních dějů by mohlo vysvětlit proč hlavně dopaminergní neurony v určitých oblastech mozku pacientů s Alzheimerovou chorobou zanikají, zatímco jiné oblasti jsou převážně nedotčeny. Tato fakta by mohla do budoucna přinést nové přehodnocení terapeutických přístupů cílených na specifické oblasti mozku. Systémová

aplikace IFN typu 1 může být v některých případech prospěšná, nese však sebou i mnohé nežádoucí účinky. Budoucí podrobnější studie by mohly napomoci ke zlepšení terapie.

[32]

6. Mikrobiom ve vztahu k autoimunitním onemocněním

V průběhu let u obyvatelstva převážně vyspělých zemí prudce narůstá výskyt autoimunitních onemocnění. Skupina těchto onemocnění zahrnuje hypersenzitivity, jakými jsou alergie a alergické astma, dále např. Crohnova choroba nově postihující ročně stovky lidí na tisíc obyvatel. Změny v mikrobiomu ovlivňují či přímo spouští další choroby mezi které patří roztroušená skleróza, ulcerózní kolitida, *diabetes mellitus* prvního typu, či revmatoidní artritida a mnoho dalších. Hovoří se o souvislostech těchto nemocí s moderním způsobem života, jehož součástí jsou vysoce hygienické návyky, užívání chemicky ošetřené vody a potravin a nadměrné používání antibiotik. Působením těchto faktorů se snižuje fyziologická mikroflóra. Jakékoli změny mikrobiomu, zejména úbytek fyziologických mikrobiot a vytvoření dysbalance, mají za následek přecitlivělost, vývoj a klinickou manifestaci autoimunitních onemocnění. K tomuto faktu se přidává skutečnost, že v chudších zemích rozvojového světa, v nichž jsou nižší hygienické standardy, jsou tato onemocnění vzácná. [2, 14, 15, 18, 19]

6.1 Mechanismus vzniku autoimunitních onemocnění CNS

O počátečních událostech, které vedou k rozvoji autoimunitního onemocnění CNS roztroušené sklerózy (RS) se toho stále neví mnoho. Roli hraje pravděpodobně souhra biologických, genetických a environmentálních faktorů, které se uplatňují jak při vzniku, tak v průběhu onemocnění. Roztroušená skleróza je nejčastějším typem autoimunitní choroby CNS. Spouštěcími faktory může být genetická predispozice ke zvýšené vnímavosti k tomuto onemocnění, stres, nedostatek vitamínu D a stále častěji se hovoří o souvislostech se střevním mikrobiomem. Dříve se přikládal velký význam infekčním mikroorganismům, ale tahle teorie nebyla doposud jako přímá příčina onemocnění prokázána. Nedávno objevené důkazy vycházející z pokusů na zvířatech naznačují přímou souvislost s komenzálními bakteriemi obývajícími GIT a roztroušenou sklerózou a ostatními autoimunitními onemocněními CNS. Mikrobiom může vyvolat přes imunitní systém aktivaci autoagresivních lymfocytů, kromě toho, několik střevních metabolitů a bakteriálních produktů může také vzájemně spolupůsobit s imunitním systémem na CNS. Dlouho převládala myšlenka, že nervový a imunitní systém nespolupracují, na základě nejnovějších studií je ovšem jasné, že spojení mezi nimi má zásadní význam pro udržování homeostázy organismu. CNS řídí imunitní systém přes některé hormony a rovněž prostřednictvím aktivace nervových drah vegetativního nervového systému.

Periferní imunitní aktivace při probíhající infekci vede naopak k behaviorálním změnám vyvolaným uvolněním cytokinových mediátorů a může např. vzniknout *sickness syndrom*. Tento syndrom se projevuje souborem příznaků jako je deprese, úzkost, poruchy spánky, snížený práh vnímání bolesti atd. Je potvrzena jeho souvislost s chronickým stresem.

I přes dlouholetý výzkum patogenních mikrobů jako potencionálních spouštěčů autoimunitních mechanismů v nervové tkáni jejich konkrétní podíl na autoimunitních onemocněních není jednoznačně stanoven. V poslední době se pozornost přesměrovává k přirozeně osídlujícím mikroorganismům jako regulátorům autoimunity CNS. Bylo prokázáno, že „germ-free“² zvířata mají vyšší náchylnost k infekcím, sníženou aktivitu trávicích enzymů a tloušťku střevní stěny. Léčba antibiotiky, které vyvolávají změny ve střevní mikroflóře, také ovlivňují závažnost onemocnění. V současnosti je však stále nejasné, za jakých okolností se jinak prospěšné mikroorganismy spustí a převzou roli patogenní. V důsledku výše prezentovaného zásadního dopadu mikroflóry na hostitelský imunitní systém lze předpokládat, že mikrobiota posouvají rovnováhu mezi ochrannými a patogenními imunitními reakcemi. Antibiotiky zprostředkovaná ochrana před autoimunitní encefalomyelitidou byla spojena s poklesem IL-17 ve sliznici střeva, čímž docházelo ke změnám jinak funkčně neměnných NK buněk. Kromě toho, antibiotická léčba vede k nárůstu počtu regulačních T-lymfocytů stejně jako B-lymfocytů.

Gnotobiotické zvířecí modely představují kmeny, které se narodí a vyrůstají v bezmikrobním prostředí. Experimentálně se na tato zvířata postupně působí jednotlivými složkami mikrobioty a sleduje se jejich reakce. Výsledkem bývají většinou různé imunopatologie. Pro posouzení vlivu střevní mikroflóry na rozvoj a průběh RS byla použita myš s experimentální autoimunitní encefalomyelitidou. Prokázalo se, že dysbióza spojená se segmentovanými filamentózními bakteriemi přispívá ve střevní sliznici modelových zvířat k indukci efektorových Th17 lymfocytů, které se podílejí na rozvoji experimentální autoimunitní encefalomyelitidy. Dále se zjistilo, že kolonizace probiotickou mikroflórou, jako je *Bifidobacterium animalis* či různé laktobacily, brání rozvoji a tlumí intenzitu zánětlivých změn mozku a míchy u zkoumaných myší. *Bacteroides fragilis* je součástí normální mikrobioty, která chrání před rozvojem modelové encefalomyelitidy tím, že stimuluje vyžívání T regulačních lymfocytů. Tyto nálezy podporují hypotézu, že mikroorganismy hrají při rozvoji autoimunitního poškození zásadní roli.

V současnosti je vyvíjena snaha o vývoj specifických bakteriálních epitopů, které jsou rozpoznávány Th17 buněčnými receptory. Tyto studie slibují nové poznatky o komunikaci

mikroflóry s hostitelským imunitním systémem a otevírají možné cesty pro rozvoj nových slizničních vakcín. [2, 18, 19, 23, 24]

6.2 Souvislost vzniku autoimunitního onemocnění s dietními faktory

Kromě specifických vlivů různých mikrobiálních organismů na imunitní systém, přicházejí nové důkazy o jejich souvislostech s dietními faktory. Ty mohou přispívat k větší vnímavosti k autoimunitní encefalomyelitidě. Střevní mikrobiota reagují na jiné složení stravy buď přímou cestou, nebo produkcí metabolitů. Zjistilo se např., že vitamin A má pozoruhodné účinky na indukci regulačních T-lymfocytů ve střevní sliznici a vitamin D3 má protektivní účinky před vznikem autoimunitní encefalomyelitidy. Další ochranný účinek náleží aryl-hydrokarbonovému receptoru¹ (AhR) a jeho ligandám. AhR ligandy jsou přítomné v brukvovité zelenině a jsou velmi důležité pro zachování střevní struktury a podílí se na střevní homeostáze. Nejnovější poznatky ukázaly, že u myši s AE krmených potravou s velkým obsahem tuku a solí docházelo ke zvýšení počtu Th17 lymfocytů, které vedly ke zvýšené produkci autoprotilátok.

Jaký podíl má mikrobiom na patogenezi RS, stále zůstává otázkou. Doposud neexistuje žádný přímý důkaz o důležitosti role střevního mikrobiomu při vzniku tohoto onemocnění. [18, 19, 24]

6.3 Predispozice k vzniku sclerosis multiplex

Příčina RS není doposud objasněna. Je prokázáno, že určitou roli zde sehrávají genetické faktory. V tomto případě se dědí genetická dispozice a vnímavost k RS. Faktory, které přispívají k rozvoji k RS je mnoho. Nejnovější studie přikládají velký význam životosprávě. Dalším rizikovým faktorem může být nedostatek vitaminu D, který spadá mezi látky, které se podílí na řízení činnosti imunitního systému, podporuje imunosupresi, zvyšuje apoptózu dendritických buněk a fagocytózu makrofágů. Dále zvyšuje aktivitu NK buněk, indukuje expresi IL-10 a antimikrobiálních peptidů. Vitamin D3 inhibuje maturaci dendritických buněk, funkci IL-1, inhibuje produkci Th1 indukovaných cytokinů, produkci IL-2, transkripci IFN- γ vazebných genů a genů kódujících neutrofilní chemotaktický faktor IL-8.

Nové poznatky naznačují, že se na rozvoji nemoci podílí i přehnané užívání krémů s vysokými opalovacími faktory. Tenhle fakt potvrzuje skutečnost, že výskyt RS může mít souvislost se slunečním zářením, které tvorbu vitaminu D v kůži podněcuje. Výskyt RS se směrem od severu k jihu snižuje a v rovníkové Africe je velmi nízký. Rovněž

v přímořských oblastech, kde je zajištěn vyšší příjem vitamínu D₃ potravou, je výskyt nižší. Dalším významným faktorem je strava, která ovlivňuje složení mikrobiomu a ten nadále imunitní systém. Je zřejmé, že nadbytek mouky, sacharidů a aditiv mohou mikrobiom nepřímo poškozovat. Výskyt RS byl také spojen se zvýšenou konzumací mléka, masa a tuku, zatímco konzumací některých polynenasycených mastných kyselin, stejně jako rostlinné vlákniny, může docházet ke snížení rizika vývoje RS. Vizí do budoucna je okamžitá úprava pacientovy mikroflóry hned po zjištění diagnózy RS. Aktuálně probíhají léčebné pokusy s výměnou mikrobiomu. Pacienti trpící touto chorobou mají prokazatelně větší propustnost střevní stěny a do krve tudíž snadněji pronikají antigeny z potravy. V důsledku toho dochází ke stimulaci imunitního systému. Dalším rizikovým faktorem může také být infekce virem Epstein-Barrové, který způsobuje infekční mononukleózu. Infekce EBV je většinou inaparentní. Dochází k infikaci 10 % B lymfocytů, latentní infekce B lymfocytů stimuluje buněčnou imunitu, především NK buňky a cytotoxické T buňky. V krvi se objevují typické lymfocyty, jsou aktivované T-lymfocyty a NK buňky, které jsou považovány za hlavní příčinu klinických příznaků onemocnění. Lidé ohrožení roztroušenou sklerózou mají vysoký titr protilátek na virus EB, a to roky před samotným nástupem nemoci. Rizikem je i infekce virem spalniček, který může vyvolat encefalomyelitidu, způsobit demyelinizaci a poškození nervů. Toto zjištění podpořila pozitivita tzv. MZR (*M-morbilli*, *R-rubeolla*, *Z-varicela zoster*) reakce ve vzorcích mozkomíšního moku. Jedná se o syntézu specifických antivirových protilátek proti neurotropním virům spalniček, zarděnek a planých neštovic. Protože se uvedené viry vyskytují v populaci zcela běžně, jejich přímý vztah k RS je nicméně diskutabilní. [18, 19, 24]

6.3.1 Příznaky roztroušené sklerózy

Objevují se poruchy zraku, nejčastěji v podobě zánětu očního nervu. Dále také poruchy citlivosti, mezi které patří necitlivost na dotyk – hypestezie a brnění – parestezie, neuralgie trojklanného nervu. Dochází k poruchám hybnosti a to ve formě svalové slabosti, zvýšení svalového tonu – spasticitě, zvýšeným reflexům. V neurologickém vyšetření jsou pozitivní pyramidové jevy (Babinsky atd.). Dále mohou být přítomny tyto příznaky: únava, diplopie, dysfagie, dysartrie, paréza lícního nervu, poruchy vyprazdňování, sexuální dysfunkce, poruchy nálady, deprese, poruchy kognice. [18, 19, 20]

6.4 Mechanismus vzniku RS

Na patofyziologii onemocnění RS se podílí více procesů. Primárně se jedná o zánětlivé onemocnění CNS s mnohočetnými zánětlivými infiltráty, demyelinizací, poškození šedé hmoty s následnou atrofií, astrogliózou a axonální degenerací. Tyto procesy nemusí být rovnoměrně zastoupeny u všech pacientů postižených touto chorobou, proto je klinický obraz a prognóza onemocnění rozdílná.

Samotný zánět je považován za klíčový z hlediska aktivity onemocnění a tvorby akutních lézí. V lézích se vyskytují aktivované T-lymfocyty, především cytotoxické, aktivovaná mikroglie, makrofágy a plazmatické buňky. K vlastní aktivaci a klonální proliferaci autoagresivních CD4⁺ T-lymfocytů a cytotoxických CD8⁺ T-lymfocytů dochází na periférii. Probíhá autoimunitní odpověď přímo proti myelinovým antigenům a to především proti MBP, myelinovému asociovanému glykoproteinu (MAG), myelinovému oligodendrocytárnímu glykoproteinu (MOG), PLP a sekundárním autoantigenům. V zánětlivém ložisku dochází k rozpadu myelinu a poškození axonů. Je potvrzeno, že stupeň axonálního poškození koreluje s mírou zánětu, který převládá v počátečních stádiích onemocnění. Demyelinizované vlákno ztrácí schopnost vedení elektrického impulsu a exprimuje na svém povrchu molekuly hlavního histokompatibilního systému MHC I třídy a dochází k přerušení vlákna CD8⁺ lymfocyty. V pozdní fázi nemoci dochází k pozvolnému poškození axonů, již bez známek průvodního zánětu. Postupem času však dochází k primární axonální degeneraci a to nezávisle na stupni zánětlivého poškození, jehož etiopatogeneze není dosud zcela objasněna. Migrace autoagresivní buněk do CNS přes HEB, která za fyziologických podmínek není propustná pro lymfocyty a ostatní buňky imunitního systému, má zásadní vliv pro formování zánětlivých RS lézí. Důležitou roli v tomto procesu sehrávají adhezivní molekuly, chemokiny a matrixové metalloproteinázy⁴ (MMPs). Chemokiny usnadňují migraci T-lymfocytů do CNS tvorbou chemického gradientu, pro který jsou T-lymfocyty vnímavé. Ukázalo se, že u pacientů v relapsu dochází ke zvýšení hladin některých chemokinů. Je zvýšen INF- γ indukibilní protein-10, který je exprimován mozkovými endoteliálními buňkami. [2, 18, 19, 20, 24]

6.5 Metabolity střev jako rizikový faktor vzniku imunitních chorob

Střevní mikrobiota produkuje mnoho ligandů, které mohou mít potencionální imunomodulační funkce na CNS. Pozoruhodným příkladem takového metabolitu jsou

masné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA), octan, butyrát a propionát. SCFA jsou vedlejším produktem kvašení rostlinných polysacharidů střevními mikroby, zejména z prebiotik, které slouží jako zdroj energie pro epitelové buňky tlustého střeva. SCFA působí protizánětlivě prostřednictvím vazby na specifické receptory spážené s G-proteinem (GPRs). Zapojení GPR43 zlepšuje kolitidy. SCFA inhibují histonové deacetylázy³ a přispívají k nárůstu regulačních T-lymfocytů. Nicméně, jejich příznivé účinky se neomezují výhradně jen na střevo. SCFA může příznivě ovlivnit i probíhající artritidu či astma. Kromě vazby na GPRs, SCFA může zprostředkovat prospěšné reakce prostřednictvím inhibice histonových deacetyláz, které vedou k indukci Treg buněk nebo produkci protizánětlivých cytokinů. Nedávné studie přinesly poznatky o potencionálním spojení mezi SCFA a CNS a ukazují, že propionát může aktivovat dráhu střevo–mozek a mít blahodárné účinky na homeostázu hostitele. *Faecalibacterium prausnitzii* produkuje butyrát, který zvyšuje tvorbu IL-10 a IL-4 a snižuje IFN- γ . Bylo zjištěno, že u nemocných postižených RS je přítomnost *Faecalibacterium prausnitzii* redukována.

Zda SCFA vykazují příznivou roli v autoimunitních onemocněních CNS doposud není potvrzeno. Je však zřejmé, že řada vedlejších produktů metabolismu střevní mikroflóry může mít vliv na imunitní systém a modulovat různým způsobem imunitní reakce. [2, 18, 19, 24]

6.6 Mikrobiální produkty jako rizikový faktor rozvoje imunitních onemocnění

Kromě metabolitů je také důležité zmínit mikrobiální produkty, které jsou efektivní složkou při komunikaci s CNS. Střevní mikrobiom je zdrojem mnoha ligandů, které mohou sensibilizovat imunitní systém a tím přispívat k rozvoji autoimunitnímu onemocnění CNS. To bylo prokázáno u polysacharidu A (PSA) produkovaném rodem *Bacteroides fragilis*. PSA ovlivňuje dendritické buňky, podporuje diferenciaci T-lymfocytů na Th1-lymfocyty, produkci IL-10 a Treg buněk. Lipid 654 by mohl být důležitým biomarkerem RS. Tento lipid je produkován rodem *Bacteroides a*, u lidí s onemocněním RS je přítomen v séru v nižší hladině ve srovnání se zdravými kontrolami. Lipid 654 je ligandem jak pro lidský, tak myší TLR. Je pravděpodobné, že mikrobiální ligandy vstupem do systémové regulace slouží jako imunoregulační faktory a již relativně nízká úroveň signalizace mikrobiálními produkty evokovaná může aktivovat imunitní práh. [2, 18, 19, 24]

7. Závěr

V průběhu let bylo získáno nespočet nových informací o patologických mechanismech autoimunitních onemocnění CNS. I přes všechny tyto pokroky, k dostatečnému pochopení spouštěcího mechanismu vedoucímu k autoimunitnímu poškození CNS stále nedošlo. Velký důraz se nyní klade na výzkum komenzálních bakterií, u kterých se předpokládá, že by mohly být potencionálními spouštěči vzniku autoimunitních onemocnění. Výzkumné studie na zvířatech umožnily bližší pochopení molekulárních základů přirozené mikrobiální flóry hostitele. V současnosti již existuje jasná souvislost mezi mikroflórou a autoimunitním onemocněním CNS prokázaná na preklinických modelech, ale doposud neexistuje dostatek informací, které by popisovaly mikrobiální kompozice pacientů trpících autoimunitním onemocněním CNS. Další výzkum vlivu střevní mikrobioty na lidský organismus a toho v jaké míře se její kvalitativní i kvantitativní změny na patogenezi autoimunitních onemocnění podílejí je nutný pro získání detailnějších znalostí. Úkolem do budoucna je dostatečná verifikace jednotlivých metabolických produktů mikrobiomu, tzv. metabolomu, majících klíčovou roli v mikrobiálním složení a kvantitě. Novou nadějnou terapií se jeví použití fekální mikrobiální transplantace, která se v současnosti zkouší v terapii autoimunitních chorob a to zejména střevních zánětů, ale také jiných onemocnění jako jsou obezita, roztroušená skleróza, Parkinsonova choroba, autismus a další. U těchto indikací je však ještě nutné pro ověření účinnosti nutné realizovat řadu kontrolovaných klinických studií. Je zřejmé, že současnost přináší stále nové multidimenzionální přístupy a je na pokraji nové éry využití lidského mikrobiomu ve vztahu k autoimunitním onemocněním.

8. Použité zkratky

ANS	autonomní nervový systém
ATP	adenosintrifosfát
ASCA	autoprotilátky proti <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
AMPs	antimikrobiální peptidy
AhR	aryl hydrokarbonový receptor
CNTF	ciliární neutrofický faktor
CFU	jednotka tvořící kolonie
CNS	centrální nervová soustava
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ECN	probiotický kmen <i>Escherichia coli</i> Nissle
FISH	fluorescenční in situ hybridizace
GABA	kyselina gama-aminomáselná
GIT	gastrointestinální trakt
GALT	střevní lymfoidní tkáň
GLUT	glukózový transportér
GPRs	specifické receptory spřažené s G proteinem
HEB	hematoencefalická bariéra
HPA	Hypotalamicko-Pituitární-Adrenalinová osa
IL-1	interleukin 1
IL-4	interleukin 4
IL-8	interleukin 8
IL-10	interleukin 10
IL-17	interleukin 17
IFN	interferon
IFN 1	interferon 1
INF-γ	interferon γ
ISGS	interferony stimulované geny
LIF	leukemii inhibující faktor
MALT	slizniční lymfoidní tkáň
MAG	myelinizovaný asociovaný glykoprotein
MOG	myelinový oligodendrocytární glykoprotein
MHC	hlavní histokompatibilní komplex

NMDA	N-methyl-D-asparagová kyselina
MMP	matrixové metaloproteinázy
MBP	bazický protein myelinu
PCR	polymerázová řetězová reakce
PSA	polysacharid A
PLP	proteolipid protein
PRR	vzory rozpoznávající receptory
RS	roztroušená skleróza
RIG	kyselinou retinovou indukovatelný gen
SFCA	mastné kyseliny s krátkým řetězcem
TNF-α	tumor-nekrózový faktor α
TLR	toll like receptory
TGF-β	transformující růstový faktor β

9. Seznam obrázků

Obrázek 1 Duální charakter vrozené imunitní odpovědi v centrálním nervovém systému (str. 26)

Obrázek 2 Osa mikrobiom–střevo–mozek ve vztahu k onemocněním centrálního nervového systému (str. 29)

10. Poznámky

¹ **Aryl-hydrokarbonový receptor:** protein, kódován AHR genem, podílí se na regulaci biologické odpovědi na aromatické uhlovodíky

² **Germ-free** zcela bez mikroflóry v GIT i na povrchu těla

³ **Histonové deacetylázy:** regulují řadu procesů a přispívají k udržení specifických buněčných funkcí, katalyzují deacetylaci aminoskupiny lysinů v N-terminální části jaderných histonů

⁴ **Matrixové metaloproteinázy:** skupina endopeptidáz, které jsou – mimo jiné – zodpovědné za degradaci mezibuněčné hmoty

⁵ **PAMP (*pathogen-associated molecular patterns*):** molekulární struktury („vzory“), které jsou typické pro membrány mikroorganismů

⁶ **PRRs (*pattern recognition receptors*):** receptory rozeznávající molekulární vzory, ale (nověji) i některé endogenní signály nebezpečí, zahrnují více rodin, např. toll-like či rig-like receptory

⁷ **RIG-like receptory (*retinoid acid inducible gene receptors*):** cytosolové receptory rozpoznávající viry, jedna z rodin PRRs

⁸ **TLRs (*toll-like receptors*):** receptory podobné toll, byly nejdříve identifikovány u mušky octomilky, kde hrají úlohu při vývoji octomilčího zárodku a při mutaci těchto receptorů se larvy vyvíjejí zmateně (německy *toll*). Postupně bylo u myši a člověka identifikováno více podtypů značených TLR-1 – TLR-10

11. Seznam použité literatury

1. ZBOŘIL, Vladimír. Mikroflóra trávicího traktu: klinické souvislosti. Vyd. 1. Praha: Grada, 2005. ISBN 80-247-0584-2
2. BERER, Kerstin a Gurumoorthy KRISHNAMOORTHY. FEBS Letters: Microbial view of central nervous system autoimmunity. Martinsried (Germany): Elsevier, 2014
3. ČEJKOVÁ, Darina a David ŠMAJS. Co nového v přírodních vědách?: Projekt lidského mikrobiomu. Universitas: Revue Masarykovy univerzity [online]. Brno: Masarykova univerzita, 2010, **2010**(02), 1–6 [cit. 2016-04-15]. Dostupné z: <https://journals.muni.cz/universitas/article/viewFile/1472/1099>
4. SONNENBURG, Justin a Erica SONNENBURG. Zdravá střeva: poznejte tajemství mikrobioty a získejte dlouhodobou kontrolu nad svou váhou, náladou a zdravím. Vydání první. Překlad Filip Drlík. V Brně: Jan Melvil Publishing, 2016. Fit. ISBN 978-80-7555-999-9
5. PETR, Jaroslav. Střevní mikrobiom v systémovém pojetí. Praha: MEDICAL TRIBUNE CZ, 2012, **2012**(1). Dostupné také z: <http://www.tribune.cz/clanek/25566-strevni-mikrobiom-v-systemovem-pojeti>
6. SLADKÁ, Jana. Lékařské listy: Mikrobiom – stále ještě nerozluštěná šifra. 2013, **2013**(1). Dostupné z: <http://zdravi.euro.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/mikrobiom-stale-jeste-nerozlustena-sifra-468772>
7. KREJSEK, Jan. *Netušený význam střevního mikrobiálního systému* [online]. Praha: Medical tribune, 2015, **2011**(14)
8. ŠÍMA, Petr a Ilja TREBICHA VSKÝ. Živa: Rozpoznávání – základ imunity V. Praha: Academia, 2010, **2010**(5). Dostupné také z: <http://ziva.avcr.cz/files/ziva/pdf/rozpoznavani-zaklad-imunity-v.pdf>
9. HOG, Matthew. Sutterella bacteria linked to autism with digestive symptoms [online]. The Environmental Illness Resource, 2014, **2012** [cit. 2016-04-16]. Dostupné z: <http://www.ei-resource.org/news/autism-news/sutterella-bacteria-linked-to-autism-with-digestive-symptoms/>
10. RODAKIS, John. Huffpost healthy living: Autism: Maybe It's Not What We've Been Told [online]. THE HUFFINGTON POST, 2015, 2015, **2015** [cit. 2016-04-16]. Dostupné z: http://www.huffingtonpost.com/john-rodakis/autism-causes_b_7172616.html

11. MOON, C., VANDUSSEN, K. L., MIYOSHI, H. & STAPPENBECK, T. S.
Development of a primary mouse intestinal epithelial cell monolayer culture system to evaluate factors that modulate IgA transcytosis. *Mucosal Immunol.* 7, 818–828 (2014)
12. PETR, Jaroslav. Český rozhlas: Leonardo – věda a technika [online]. Praha, 2011
Dostupné z: http://www.rozhlas.cz/leonardo/clovek/_zprava/jaky-mate-enterotyp--887608
13. WILLIAMS, Brent, Mady HORNING a Ian LIPKIN. MBio: Application of Novel PCR-Based Methods for Detection, Quantitation, and Phylogenetic Characterization of *Sutterella* Species in Intestinal Biopsy Samples from Children with Autism and Gastrointestinal Disturbances [online]. Rhode Island: Brown University, 2012, **2011**
14. HRABÁK, Pavel. Česká gastroenterologická společnost: Funkční poruchy a mikrobiom [online]. Praha: IV. interní klinika VFN a 1. LF UK [cit. 2016-04-16].
Dostupné z: http://cgs-cls.cz/wp-content/uploads/2016/02/02__p_hrabak_praha.pdf
15. JIRKŮ-POMAJBÍKOVÁ, Kateřina a Julius LUKEŠ. Akademický bulletin: Ovlivňují střevní organismy naše zdraví?. Praha: AV ČR, 2015, **2015**(4). ISSN 1210-9525. Dostupné také z: <http://abicko.avcr.cz/2015/04/03/>
16. World J, *Gastroenterol.* 2009; 15 (5): 521–5
17. PREIDIS, Geoffrey a James VERSALOVIC. Gastroenterology: Targeting the Human Microbiome With Antibiotics, Probiotics, and Prebiotics: Gastroenterology Enters the Metagenomics Era [online]. Brown University, 2009, **2008** [cit. 2016-04-17]. DOI: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2009.01.072>. Dostupné z: [http://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085\(09\)00293](http://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085(09)00293)
18. KRASULOVÁ, Eva. Imunologie a roztroušená skleróza: Roztroušená skleróza nemusí být handicapem. [cit. 2016-04-17]. Dostupné z: http://portal.klubsms.cz/assets/files/prednasky/Krasulova_imunita.pdf
19. BENEŠOVÁ, Yvonne. Roztroušená skleróza. Informační systém Masarykovy univerzity [online]. Brno: Masarykova univerzita, 2016 [cit. 2016-04-17]. Dostupné z: <http://is.muni.cz/do/rect/el/estud/lf/js13/rs/web/pages/02-etiotogeneze-roztrousene-sklerozy.html>
20. KRASULOVÁ, Eva. Demyelinizační onemocnění CNS. In: Neurologická klinika 1. LF UK a VFN [online]. Praha: Karlova univerzita, 2015 [cit. 2016-04-17]. Dostupné z: http://www.neuro.lf1.cuni.cz/vyuka/soubory/fyzio/3r_rs_2012.pdf

21. NICK, Gina. About sickness syndrome. In: *Drgina* [online]. Beverly Hills: HealthBridge Medical Center, 2016 [cit. 2016-04-27]
22. YANG, Y., M. GOBERT a M. TORCHINSKY. Focused specificity of intestinal TH17 cells towards commensal bacterial antigens. *Nature* [online]. 2014, **2013**(5), 152–156 [cit. 2016-04-27]. DOI: 10.1038/nature07240. Dostupné z: <http://www.nature.com/nature/journal/v510/n7503/full/nature13279.html>
23. ATARASHI, K., J. NISHIMURA a T. SHIMA. ATP drives lamina propria TH17 cell differentiation. *Nature* [online]. Nature, 2008, **2008**(455), 808–812 [cit. 2016-04-27]. DOI: 10.1038/nature07240. Dostupné z: <http://www.nature.com/nature/journal/v455/n7214/full/nature07240.html>
24. WANG, Y. a L. KASPER. The role of microbiome in central nervous system disorders. *Brain, behavior and immunity*[online]. Elsevier, 2014, **2013** [cit. 2016-04-27]. DOI: 10.1016/j.bbi.2013.12.015
25. ZÁVADA, Filip. Interní medicína pro praxi: Gastrointestinální imunitní systém. Praha: Solen, 2010, **2010**(7). Dostupné také z: <http://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2010/06/05.pdf>
26. FRÍČ, Přemysl. Interní medicína pro praxi: Střevní mikroflóra, gastrointestinální ekosystém a probiotika. Praha: Solen, 2010, **2010**(7)
27. KREJSEK, Jan, Manuela KUDLOVÁ, Martina KOLÁČKOVÁ a Jakub NOVOSAD. Pediatrie pro praxi: Nutrice, probiotika a imunitní systém II.část: Nutrice, přirozená slizniční mikroflóra a individuální imunitní reaktivita. Praha: Solen, 2007, **2007**(3)
28. VERNEROVÁ, Eva. Pediatrie pro praxi: Slizniční imunita u dětí, možnosti imunomodulace a alergie. Praha: Solen, 2008, **2008**(3)
29. KEUNEN, Kristin a Ruurd VAN ELBURG. Pediatric research: Impact of nutrition on brain development and its neuroprotective implications following preterm birth. *Nature* [online]. 2015, **2014**(77), 148–155 [cit. 2016-04-17]. DOI: 10.1038/pr.2014.171. Dostupné z: <http://www.nature.com/pr/journal/v77/n1-2/abs/pr2014171a.html>
30. LYTE, Mark a John CRYAN. Microbial Endocrinology: The microbiota-Gut-Brain Axis in Health and Disease. New York: Springer, 2014. ISBN 978-1-4939-0896-7
31. Kuncová A., Horáček J.: Role imunitního systému v patofyziologii schizofrenie. *Psychiatrie* 2009, 13(4), s. 169–175

32. ZEGENHAGEN, Loreen, Chaitanya KURHADE, Nikolaus KONISZEWSKI, Anna ÖVERBY a Andrea KRÖGER. *Cytokine & Growth Factor Reviews: Brain heterogeneity leads to differential innate immune responses and modulates pathogenesis of viral infections*. Elsevier, 2016, **2016**(006). Dostupné také z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2016.03.006>

Citováno z: <http://www.citace.com/>